

茶多酚对宁波近海水体 8 种常见重金属联合毒性的拮抗作用

周 琪, 苏 红, 王亚飞, 谷元亮, 岳 霞, 毛国传, 邹宝波, 赵进顺*

(宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 采用小鼠皮肤细胞株(JB6 细胞)通过体外实验探索抗氧化剂茶多酚(Epigallocatechin gallate, EGCG)对 8 种常见重金属混合污染物的体外联合毒性是否具有拮抗作用, 为环境中多种重金属的联合毒性研究及评估和防治提供科学依据. 基于文献对宁波养殖水体中 8 种常见重金属污染物的暴露情况进行评估, 确定联合暴露比例. 以此固定比例组成多元重金属混合物, 采用细胞学实验, 比较在重金属混合污染物暴露细胞的基础上加或不加 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗氧化剂茶多酚对细胞生存活力、细胞周期、细胞内氧化应激的影响以及对 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达情况的影响. 结果显示: 重金属混合物可以降低细胞生存活力, 阻滞细胞周期, 而 EGCG 能够明显地缓解 8 种重金属混合污染物的细胞毒性, 提高细胞的生存率, 减轻细胞周期的阻滞, 使细胞内转录因子 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平下调.

关键词: 重金属混合污染物; 联合毒性; EGCG; 细胞周期; 氧化应激

中图分类号: O651; R285

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2017) 01-0104-06

重金属元素是地壳岩石中的天然组分, 由于人类的采矿、冶炼、工业生产以及煤、石油燃料燃烧等行为, 重金属元素逐步进入大气、水、土壤, 进而过量累计引起环境污染^[1], 其中, 水源是最主要的污染领域. 重金属可以通过食物链经水生藻类、植物、动物器官组织逐级浓集放大, 最终进入并蓄积在人体内. 水以及水中生物(包括鱼虾贝类)中的重金属污染与富集, 是重金属污染危害人类健康的重要途径^[2].

茶多酚作为一种天然抗氧化剂和重金属络合剂, 是茶叶浸出物中含量最高的抗氧化物质^[3]. 研究表明, 绿茶可以预防不同类型的癌症, 如膀胱癌、前列腺癌、食管癌和胃癌等^[4]. 茶多酚主要成分是儿茶素、黄酮醇和其他有机化合物, EGCG 是儿茶素中含量最高的组分, 约占儿茶素的 60%, 具有抗氧化、抗炎和抗癌的作用^[5]. EGCG 抗氧化作用是通过清除或抑制自由基, 通过与重金属离子的络合, 而降低重金属离子对氧化反应的催化.

EGCG 能激活体内其他抗氧化剂(如乙二胺四乙酸二钠钙(EDTA2NaCa)、还原性谷胱甘肽(GSH)等)的活性, 同时与其发挥协同作用^[6]. Johnson 等^[7]发现不同浓度 EGCG 对细胞内的 DNA 作用不一样, 低浓度 EGCG 对 DNA 的保护作用主要是抑制活性氧引起损伤, 反之, 高浓度 EGCG 会对细胞内的 DNA 造成损伤. Lin 等^[8]研究发现, EGCG 对突触的保护作用主要通过络合铁离子, 降低体内铁离子浓度, 进而减少脂质过氧化损伤. 因此, EGCG 在实验条件下可通过拮抗活性氧基团或直接与铬、铅、镉等重金属离子络合来降低其生物毒性.

目前, 因为生物的蓄积和富集作用, 膳食中重金属暴露对人体健康而言尤为特殊. 任敏等^[9]通过检测宁波多个地区的 21 个贝类样品, 发现在样品中有不同程度的多种重金属蓄积. 宁波地区人群因喜食水产品的习俗, 与内陆地区相比, 更易遭受重金属污染. 针对具体情况, 笔者采用宁波市 8 种重金属污染物的含量比例与养殖水体中含量比例

收稿日期: 2015-11-20.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(81273111); 浙江省公益性技术应用研究计划项目(2015C33148).

第一作者: 周琪(1992-), 女, 江西九江人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 职业与环境流行病学. E-mail: zhouqi1992@yeah.net

*通信作者: 赵进顺(1960-), 男, 山东海阳人, 教授, 主要研究方向: 预防医学、职业与环境医学. E-mail: zhaojinshun@nbu.edu.cn

相似配比为重金属混合物, 探索抗氧化剂 EGCG 对重金属混合物的联合毒性化学拮抗作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

四水氯化锰($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、2.5 水合氯化镉($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$)、重铬酸钾($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)、五水硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、六水合氯化镍($\text{Cl}_2\text{H}_{12}\text{NiO}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、七水硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、三水醋酸铅($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)均为分析纯, 购于北京国药有限公司。氯化甲基汞(CH_3ClHg)购买自德国 Ehrenstorfer GmbH 公司。实验用细胞株为小鼠正常上皮 JB6 细胞系, 美国职业安全与健康研究所赠送。ST-360 酶标仪购买自上海智华医学精密仪器有限公司, FACS Calibur 流式细胞仪和蛋白电泳及转印装置购买自美国 Bio-Rad 公司。小牛血清购买自杭州四季青公司, DMEM 培养基和 Tris-EDTA 购买自美国 Gibco 公司, (-)-表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)购买自美国 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 8 种常见重金属混合污染物及 EGCG 比例的选定及配置

选用宁波水系中常见的 8 种重金属混合污染物(Pb、Cu、Cd、Hg、Zn、Mn、Ni、Cr)为对象进行研究, 根据文献[10-11]和海水水质标准(GB 3097-1997, II 类), 确定本研究中所用重金属离子的质量浓度(表 1), 用高纯水配制的 8 种重金属离子混合污染物工作液质量浓度分别是 2.523, 5.047, 7.570, 10.093, 12.617, 15.140 和 17.663 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 以

这些浓度分别处理细胞, 记为处理组 1、2、3、4、5、6、7, 在重金属混合物处理细胞基础上, 同时加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗氧化剂 EGCG^[12], 以不做任何处理的 DMEM 培养基作为空白对照组。

1.2.2 细胞培养

用含有体积分数 10%无支原体新生小牛血清和 1%双抗青霉素和链霉素(美国 Gibco 公司)的 DMEM 高糖培养基培养正常小鼠皮肤细胞(JB6), 置于 37°C 、5%体积分数 CO_2 的培养箱(Thermo Scientific)中培养。

1.2.3 MTT 实验

收集对数生长期的 JB6 细胞制成 2.5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的单细胞悬液, 96 孔板接种细胞, 每孔加 0.2 mL, 37°C 、5%体积分数 CO_2 的培养箱中培养 24 h 后, 按预先设定好的浓度梯度处理细胞。每个浓度均设 6 个平行孔。细胞染毒 24 h 后去掉培养基, 每孔添加 $20 \mu\text{L}$ MTT($5 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)和 $180 \mu\text{L}$ 新培养基, 继续培养 4 h 后, 丢弃培养基, 每孔加 DMSO $150 \mu\text{L}$, 均匀振动 5~10min, 检测 OD_{490} , 记录吸光度。

1.2.4 细胞周期实验

收集对数生长期 JB6 细胞制成 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的单细胞悬液, 6 孔板接种细胞, 每孔加 2 mL, 在 37°C 、5%体积分数 CO_2 的细胞培养箱中培养 24 h, 按设定好的浓度梯度分别处理细胞。细胞暴露染毒 24 h, 弃掉培养基, 胰酶消化后离心(4°C , $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min)收集细胞。加入 2 mL 预冷的 70%乙醇吹散细胞成单细胞悬液, -20°C 保存。含乙醇的细胞于 4°C 及 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 去掉固定液乙醇, PBS 清洗后再次离心去掉上清。按说明书要

表 1 8 种常见重金属污染物的离子浓度

重金属	重金属离子质量 浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	对应的化合物	1g 金属离子所需相应 化合物的质量/g	储备液中离子的质量 浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
铜	2.050	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3.901 4	2.050
铅	2.500	$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1.832 5	2.500
镉	0.150	$\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$	2.031 0	0.150
锌	13.200	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.398 7	13.200
汞	0.033	CH_3ClHg	1.251 6	0.033
铬	0.300	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	5.657 3	0.300
锰	5.000	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5.602 0	5.000
镍	2.000	$\text{Cl}_2\text{H}_{12}\text{NiO}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4.049 9	2.000

求加入染料 PI, 充分混匀后避光孵育 30 min, 进入流式细胞仪测定, 并用 488 nm 波长激发。

1.2.5 蛋白免疫印迹实验

收集对数生长期的 JB6 细胞制成 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的单细胞悬液, 6 cm 皿接种细胞, 每皿加 5 mL, 在 37°C , 5% CO_2 浓度下放入湿化恒温培养箱中贴壁培养 24 h 后, 更换新鲜培养基, 再根据预先设定的浓度分别处理细胞。培养 24 h 后丢弃培养基, 胰酶消化后离心(4°C , $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min)收集细胞, 细胞沉淀中加 100 μL 含有蛋白酶抑制剂的 NP40 裂解液冰上裂解 40~60 min, 然后离心(4°C , $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 20 min)取上清液, 利用 BCA 蛋白定量法定量蛋白, 以每孔 50 μg 的蛋白上样, 进行电泳。将曝光好的胶片用凝胶图像处理系统扫描、拍照及分析。

1.2.6 数据处理

上述所有实验均重复 3 次, 采用均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)描述统计数据, 用 SAS 9.1 软件进行统计分析, 各组间统计学差异显著性检验采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 说明差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 细胞生存率结果

在重金属混合物处理细胞的基础上, 同时加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗氧化剂 EGCG, 检测此时的细胞增殖情况。如图 1 所示, 不同浓度的重金属混合物(对照组, 处理组 1~7)染毒细胞 24 h 后, 随着染毒浓度升高, 细胞生存率逐渐下降, 加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗氧化剂 EGCG 组的细胞活力明显强于未加 EGCG 组, 未加 EGCG 组与加入 EGCG 组之间的差异有统计学意义($P<0.05$)。表 2 是细胞活力的百分比及分析结果, 比较发现, 随着染毒浓度的加大, 不论是加 EGCG 或者未加 EGCG, 细胞活力均逐渐下降, 但加入 EGCG 组相比未加入 EGCG 组的, 细胞活力明显增加。

2.2 细胞周期结果

本研究中, 采用流式细胞仪分析时已自动将 G2 期和 M 期合并, 记为 G2 期。在重金属混合物处理细胞的基础上, 同时加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG, 检测细胞周期分布情况。如图 2 所示, 随着染毒浓度

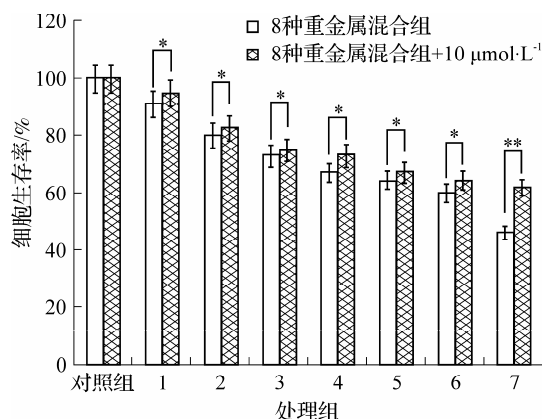


图 1 抗氧化剂 EGCG 对细胞生存率的影响
(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

表 2 抗氧化剂 EGCG 对细胞生存率的影响($\bar{x} \pm S$)

剂量组	未加茶多酚组	加茶多酚组
对照组	100 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00
1	90.65 $\pm$ 3.84	94.77 $\pm$ 1.01 ¹⁾
2	80.14 $\pm$ 2.02	82.59 $\pm$ 1.80 ¹⁾
3	72.53 $\pm$ 4.26	74.34 $\pm$ 1.69 ¹⁾
4	66.62 $\pm$ 3.27	72.20 $\pm$ 0.61 ¹⁾
5	64.28 $\pm$ 4.71	67.17 $\pm$ 1.59 ¹⁾
6	59.19 $\pm$ 10.55	64.34 $\pm$ 2.33 ¹⁾
7	45.94 $\pm$ 2.46	61.18 $\pm$ 2.77 ²⁾

注: 与相应的未加茶多酚组相比, 差异有统计学意义, 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$, 下表同。

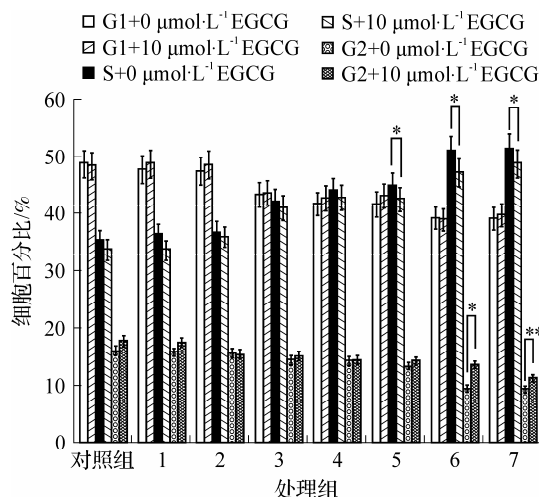


图 2 抗氧化剂 EGCG 对细胞周期的影响
(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

升高, 细胞 S 期的阻滞情况明显上升, 加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗氧化剂 EGCG 组细胞 S 期的阻滞情况明显低于未加 EGCG 组; 处理组 5~7 相比, 差异均有

统计学意义($P<0.05$). 加入 EGCG 组的 G2 期细胞明显增多, 相比未加 EGCG 组, 处理组 6~7 相比差异均有统计学意义. 表 3 是细胞处于各期的百分比及分析结果, 比较发现, 随着染毒浓度的加大, 不论是加 EGCG 或者未加 EGCG, 处于 S 期的细胞都逐渐增加, 但加入 EGCG 组相比未加入 EGCG 组, 其细胞处于 S 期的数目明显减少, G2 期逐渐增加.

2.3 蛋白免疫印迹结果

通过 West-blotting 方法检测细胞内 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达水平. 图 3(a)是在不加 EGCG 情况下, 随着重金属混合物浓度的升高, Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达水平相比对照组均明显上升; 图 3(b)是加入 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG 的情况下, 相比未加 EGCG 组, Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达水平明显降低, 各组内参之间没有差异.

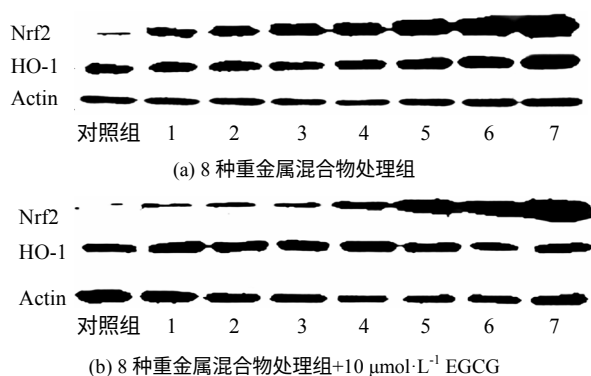


图 3 抗氧化剂 EGCG 对细胞内蛋白表达的影响

3 讨论

在日常生活中, 不是每种重金属对人体都会造成损害, 有些重金属如锌、铁、铜等作为人体所

必需的微量元素, 只有当机体的摄入量超过一定限度时才会影响身体健康, 出现重金属中毒. 然而, 在实际接触过程中, 多种重金属污染物往往正是同时存在并同时进入人体内的^[13]. 本研究拟采用宁波地区 8 种常见重金属污染物(铜、铅、镉、锌、汞、铬、锰、镍), 按实际污染浓度比例配制混合物, 同时, 探讨抗氧化剂 EGCG 是否对重金属混合污染物的联合毒性具有拮抗保护作用, 并探讨其分子机制.

本文以质量浓度 $2.523, 5.047, 7.570, 10.093, 12.617, 15.140$ 和 $17.663\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 作为重金属混合污染物处理组 1~7 浓度, 在此基础上, 加入 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 抗氧化剂 EGCG 分别处理 JB6 细胞进行细胞增殖实验. 实验结果表明, 不同浓度的重金属混合物染毒细胞 24 h 后, 随着重金属混合物浓度的增加, 细胞生存活力逐渐下降. 同时加 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG, 结果显示随着染毒浓度的加大, 不论是加 EGCG 或者未加 EGCG, 细胞活力均逐渐下降, 但加入 EGCG 组相比未加入 EGCG 组, 其细胞活力明显增加, 两组之间的差异有统计学意义($P<0.05$), 说明抗氧化剂 EGCG 能够降低重金属混合污染物引起的细胞毒性.

细胞周期分 G1、S、G2 和 M 共 4 个阶段, 是细胞一次分裂完成到下一次分裂结束所经历的全过程, 从而实现细胞的生长、分裂、增殖. 此过程存在一套精密的调控系统, 即细胞周期调控机制. 细胞周期分为间期与分裂期两个阶段, 有丝分裂到 DNA 复制前是 G1 期, DNA 合成期是 S 期, DNA 合成后期是 G2 期, 这 3 个阶段均为间期, 细胞分

表 3 抗氧化剂 EGCG 对不同浓度重金属混合物的 JB6 细胞周期的影响($\bar{x}\pm S$)

剂量组	G1		S		G2	
	未加茶多酚	加茶多酚	未加茶多酚	加茶多酚	未加茶多酚	加茶多酚
对照组	48.74 ± 0.76	48.43 ± 1.30	35.20 ± 1.49	33.72 ± 0.96	16.05 ± 1.00	17.85 ± 2.14
1	47.76 ± 0.81	48.74 ± 0.11	36.39 ± 2.18	33.68 ± 0.81	15.86 ± 1.45	17.58 ± 0.92
2	47.49 ± 1.39	48.63 ± 0.51	36.79 ± 0.82	35.92 ± 0.93	15.73 ± 0.57	16.11 ± 0.71
3	43.34 ± 0.68	43.70 ± 1.05	42.17 ± 0.65	41.08 ± 0.25	14.49 ± 0.03	15.22 ± 0.80
4	41.66 ± 1.21	42.66 ± 2.68	44.04 ± 0.96	42.85 ± 1.51	14.30 ± 0.65	14.49 ± 2.73
5	41.65 ± 0.88	43.09 ± 1.20	44.91 ± 0.95	$42.62\pm 0.67^{1)}$	13.44 ± 0.07	14.28 ± 2.54
6	39.23 ± 0.22	38.93 ± 0.67	51.21 ± 0.50	$47.32\pm 0.91^{1)}$	9.57 ± 0.28	$13.75\pm 1.53^{1)}$
7	39.09 ± 0.71	39.71 ± 1.33	51.53 ± 0.79	$48.75\pm 0.82^{1)}$	9.38 ± 0.16	$11.54\pm 0.57^{2)}$

裂期是 M 期. 不同浓度的重金属混合污染物处理细胞 24 h 后, 对照组停滞在 S 期的细胞比例为 35.2%, 但处理组则逐渐增加到 51.53%, 可能是由于重金属混合物引起. S 期停滞的原因有两点: 首先, 可能是 G1/S 期的转换过快, 使得细胞进入 S 期的速度加快; 其次, 可能由于 DNA 的不完全复制以及其损伤修复等原因, 造成细胞不能进入 G2/M 期, 从而停留在 S 期, 进一步造成细胞增殖减慢, 此结果与 MTT 实验结果得到了相互印证.

EGCG 通过调控致癌物的代谢途径来影响癌基因的表达式, 并抑制癌细胞合成 DNA^[14], 或通过改变细胞周期蛋白表达从而抑制肿瘤细胞生长^[15], 并抑制端粒酶的活性^[16], 进而诱导肿瘤细胞凋亡而达到抗癌作用. 在本研究中, 在不同浓度重金属混合污染物处理细胞 24 h 后, 加入抗氧化剂 EGCG 组的细胞活力明显强于未加 EGCG 组, 它们之间的差异有统计学意义. 在细胞周期检测中, 加入 EGCG 组相比未加入 EGCG 情况, 细胞处于 S 期的数目明显减少, G2 期逐渐增加, 说明 EGCG 能够缓解重金属混合物引起的细胞阻滞情况.

核转录因子 Nrf2 可进入细胞核内, 与其下游多个基因启动子区域的抗氧化反应元件结合, 诱导基因表达, 进而调控细胞内的氧化应激反应. Nrf2 还能提高细胞清除活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)的能力, 从而维持细胞内环境的稳定, 并对氧化应激引起的损伤有一定保护作用^[17]. 血红素单加氧酶-1(HO-1)是 Nrf2 激活的下游基因启动子区域抗氧化反应元件中的一种, Nrf2 也是调控 HO-1 转录与表达的关键因子; 大量研究表明, HO-1 在正常情况下表达量很少, 但对多种有害的细胞外刺激具有保护作用, 通过诱导表达量增加等方法可以明显增加细胞耐受力以及机体的抵抗力^[18]. 研究发现, 类金属砷能与细胞中的酶系统结合, 使酶的生物作用受到抑制而失去活性, 并且使机体发生氧化应激反应, ROS 产生增多, 从而引起 Nrf2 和 HO-1 表达增加^[19]. 本研究结果显示, 相比对照组, 处理组 Nrf2 的蛋白表达水平逐渐升高, 由于激活的 Nrf2 与其下游多个基因启动子区域的抗氧化反应元件结合, 诱导 HO-1 基因表达增加, 而加入 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG 组的细胞内 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达水平明显低于未加 EGCG 组, 说明重

金属混合物会增加细胞的氧化应激损伤, 而抗氧化剂 EGCG 对缓解重金属混合污染物引起的氧化应激损伤起着一定的作用.

由以上结果可以看出, 抗氧化剂 EGCG 可以明显的缓解 8 种重金属混合污染物的细胞毒性, 提高细胞的生存率, 并且在一定程度上不仅可以拮抗重金属混合污染物的致凋亡和致癌作用, 还可以缓解细胞的氧化应激损伤.

参考文献:

- [1] KUMAR SHARMA R, AGRAWAL M, MARSHALL F. Heavy metal contamination of soil and vegetables in suburban areas of Varanasi, India[J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2007, 66(2):258-266.
- [2] ULUTURHAN E, KUCUKSEZGIN F. Heavy metal contaminants in Red Pandora (*Pagellus erythrinus*) tissues from the Eastern Aegean Sea, Turkey[J]. *Water Research*, 2007, 41(6):1185-1192.
- [3] JAIN A, MANGHANI C, KOHLI S, et al. Tea and human health: The dark shadows[J]. *Toxicology Letters*, 2013, 220(1):82-87.
- [4] 王婧, 高玉堂. 茶多酚抗癌的流行病学研究进展[J]. *肿瘤*, 2011, 31(6):553-557.
- [5] HIGDON J V, FREI B. Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions[J]. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 2003, 43(1):89-143.
- [6] 李叶云, 江昌俊, 王秀丽. 茶多酚的生物活性及药理学研究进展[J]. *安徽中医学院学报*, 2002, 21(5):57-60.
- [7] JOHNSON M K, LOO G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA[J]. *Mutation Research/DNA Repair*, 2000, 459(3): 211-218.
- [8] LIN A M, CHYI B, WU L, et al. The Antioxidative property of green tea against iron-induced oxidative stress in rat[J]. *Chinese Journal of Physiology*, 1998, 41 (4):189-194.
- [9] 任敏, 徐国峰, 孔定江, 等. 宁波海区经济贝类重金属污染现状及对人体健康风险分析[J]. *海洋开发与管理*, 2010, 27(9):58-60.
- [10] 尤仲杰, 康飞金, 王建萍, 等. 宁波地区滩涂贝类养殖区环境及贝体重金属含量与评价[J]. *海洋环境科学*, 2011, 30(4):508-511.
- [11] 王金辉, 秦玉涛, 孙亚伟, 等. 象山港重点增殖区重金属残留量分布及污染源分析[J]. *海洋渔业*, 2006, 27 (3):225-231.

- [12] WU F, SUN H, KLUZ T, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects against chromate-induced toxicity in vitro[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2012, 258 (2):166-175.
- [13] CORY-SLECHTA D A. Studying toxicants as single chemicals: Does this strategy adequately identify neurotoxic risk?[J]. Neurotoxicology, 2005, 26(4):491-510.
- [14] ADHAMI V M, AHMAD N, MUKHTAR H. Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention[J]. The Journal of Nutrition, 2003, 133(7):2417S-2424S.
- [15] GUPTA S, AHMAD N, NIEMINEN A L, et al. Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2000, 164(1):82-90.
- [16] MITTAL A, PATE M S, WYLIE R C, et al. EGCG down-regulates telomerase in human breast carcinoma MCF-7 cells, leading to suppression of cell viability and induction of apoptosis[J]. International Journal of Oncology, 2004, 24(3):703-710.
- [17] FLORA S J. Arsenic induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of N-acetylcysteine and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid in rats[J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 1999, 26(11):865-869.
- [18] WILD A C, MOINOVA H R, MULCAHY R T. Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(47):33627-33636.
- [19] 李冰, 刘洁, 李昕, 等. 亚砷酸钠对核转录因子 Nrf2 和血红素单加氧酶-1 表达的影响[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(12):1058-1060.

Antagonism effect of tea polyphenols to the joint toxicity of heavy metal mixtures on the offshore water in Ningbo area

ZHOU Qi, SU Hong, WANG Ya-fei, GU Yuan-liang, YUE Xia, MAO Guo-chuan,
ZOU Bao-bo, ZHAO Jin-shun*

(Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In this study, *in vitro* experiments were used to explore the antagonism effect and underlying mechanisms of antioxidant epigallocatechin gallate (EGCG) to the heavy metal mixture which is consisted of eight common heavy metal contaminants in the surface water of Ningbo area in China. These results will be useful as an important reference for the study on the prevention and treatment for multi-heavy metal pollutant mixture. Through the present situation of literature to understand the pollution of heavy metals in Ningbo city, and according to the literature and sea water quality standard, we can determine the concentration of eight common heavy metal ions in the surface water of Ningbo area for this experiment. At the same time, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ antioxidant polyphenols (Epigallocatechin gallate, EGCG) was tested to antagonize the toxicity effects of this mixture. Our results demonstrate that the mixture of heavy metal pollutants could arrest the JB6 cell cycle at S phase. Addition of EGCG in the mixture could inhibit the cell toxicity, relieve cell cycle arrest, and down-regulate the expressions of Nrf2 and HO-1.

Key words: mixed heavy metal-pollutants; joint toxicity; EGCG; cell cycle; Oxidative stress

(责任编辑 章踐立)